



**Eficacia del extracto de *Portulaca oleracea* como inductor de la
diferenciación de células NHBE y HEp-2**

**Atencia Ortega Andrés Camilo
Palmera Cárcamo Rubén Darío
Pérez Lora Carolina Sofía
Pérez Orozco Andrea Carolina
Peña García Elkin David**

**Universidad del Norte
Departamento de Salud Pública
Barranquilla - Colombia
2019**



Universidad del Norte - Pregrado Medicina

**Eficacia del extracto de *Portulaca oleracea* como inductor de la
diferenciación de células NHBE y HEp-2**

Atencia Ortega Andrés Camilo

Palmera Cárcamo Rubén Darío

Pérez Lora Carolina Sofía

Pérez Orozco Andrea Carolina

Peña García Elkin David

Trabajo realizado para optar por título de Médico

Asesor metodológico: Ms. Víctor Alfonso Flórez García

Asesor de contenido: Ms. Alma del Socorro Polo Barrios

Universidad del Norte

Departamento de Salud Pública

Barranquilla - Colombia

2019

NOTA DE ACEPTACIÓN

PRESIDENTE DEL JURADO

Jurado

Jurado

Barranquilla, 9 de junio de 2019

DEDICATORIA

Al creador de todas las cosas, por permitirnos culminar este proyecto a pesar de las adversidades que se presentaron.

A nuestros familiares y amigos quienes contribuyeron brindándonos apoyo y fortaleza durante el desarrollo del presente informe.

A todos los profesores que hicieron parte de la planeación, desarrollo y culminación de todo este proceso.

AGRADECIMIENTOS

Agradecemos principalmente a las personas que nos guiaron en el ideación, planeación y ejecución de este proyecto, la Dra. Alma del Socorro Polo Barrios, por asesorarnos durante todo el proceso de construcción del proyecto, ayudarnos a buscar soluciones cuando se presentaron inconvenientes y enseñarnos lo necesario para llevar a cabo la parte técnica de este estudio, así como también al apoyo recibido por parte de los Dr. Edwin De la Cruz y Jhon Hennesy quienes colaboraron en los procedimientos desarrollados para lograr la culminación del mismo.

El Ms. Víctor Alfonso Flórez García, por ayudarnos a hilvanar nuestras ideas con la realidad de lo procedimental, a la Ms. Mariela Borda por ser nuestra tutora cuando dábamos los primeros pasos y construimos las bases de lo que esto es ahora y Dr. Julián Fernández por ayudarnos a seguir sentando las bases de los que realizamos, realizar su labor con amor y paciencia y estar dispuesto a colaborarnos en todo lo que fue necesario. Por todo esto y mucho más, muchas gracias a ustedes.

CONTENIDO

Pág.

DEDICATORIA.....	4
AGRADECIMIENTO.....	5
RESUMEN.....	9
PALABRAS CLAVES.....	10
CAPÍTULO 1.....	11
1.1 Naturaleza del problema de investigación.....	11
1.2 Formulación del Problema de investigación.....	12
1.3 Justificación.....	12
1.4 Objetivo General.....	16
1.5 Objetivos específicos.....	16
1.6 Propósito.....	17
CAPÍTULO 2.....	18
2.1 Marco Teórico.....	18
2.1.1 Portulaca oleracea.....	18
2.1.2 Células normales de epitelio bronquial (NHBE).....	19
2.1.3 Descripción genética de células NHBE.....	20
2.1.4 Célula de carcinoma epidermoide humano cepa 2 (HEp-2).....	21

2.1.5 Descripción genética células HEp-2.....	22
2.1.6 Regulación de la pluripotencialidad y diferenciación.....	23
2.1.7 Preparación de los insumos necesarios para la inducción del proceso de diferenciación.....	24
2.1.8 Eficacia.....	25
CAPÍTULO 3. METODOLOGÍA.....	27
3.1 Tipo de Estudio.....	27
3.2 Procedimiento.....	27
3.2.1 Fase de obtención y preparación de los insumos necesarios para llevar a cabo el proceso de inducción de diferenciación.....	28
3.2.2 Análisis de los cultivos celulares.....	30
3.3 Procesamiento de datos.....	33
3.4 Presentación y análisis de resultados.....	33
CAPÍTULO 4: RESULTADOS.....	34
4.1 Evaluar el crecimiento y la viabilidad de los cultivos celulares previo a la aplicación del extracto.....	33
4.2 Caracterización génica de las líneas celulares NHBE y HEp-2.....	37
4.3 Evaluar la actividad inductora de diferenciación celular del extracto obtenido a partir de <i>Portulaca oleracea</i>	40
CAPÍTULO 5: DISCUSIÓN.....	42
CAPÍTULO 6: CONCLUSIONES.....	46
7. REFERENCIAS.....	47
8. ANEXOS.....	55

LISTAS ESPECIALES

	Pág.
Imagen 1. Pureza y concentración de ADN de HEp-2.....	34
Imagen 2. Pureza y concentración de ARN de HEp-2.....	35
Imagen 3. Pureza y concentración de ADN de NHBE.....	36
Imagen 4. Pureza y concentración de ARN de NHBE.....	36
Imagen 5. Electroforesis en gel de agarosa.....	38
Imagen 6. Células HEp-2 a 4X.....	38
Imagen 7. Células HEp-2 a 4X.....	39
Imagen 8. Células HEp-2 a 4X.....	39
Imagen 9. Células HEp-2 a 4X.....	40
Imagen 10. Células HEp-2 a 4X y 10 días de cultivo.....	42

RESUMEN

Introducción: En la actualidad la búsqueda de novedosas sustancias capaces de inducir la diferenciación de líneas celulares humanas es un campo de investigación que genera gran interés, por lo tanto las técnicas de biología molecular y de biotecnología van enfocadas a determinar que sustancias son capaces de inducir la diferenciación celular, factores moleculares como BMP-2 y TGF β s constituyen un pilar importante en dicho proceso; por su parte células como las NHBE (células epiteliales humanas normales) y HEP-2 (células de carcinoma epidermoide humano) bajo condiciones específicas nutricionales y de factores de inducción de la expresión génica pueden expresar marcadores moleculares específicos de diferenciación celular (SOX 2, NANOG, OCT), debido a estas características propias de dichas células y a los efectos antiinflamatorios demostrados que posee la *Portulaca oleracea* que podrían inducir diferenciación celular, se quiso determinar si los extractos producidos a partir de dicha planta podían inducir la expresión de genes de dichos.

Metodología: Se realizó un estudio experimental donde se llevó a cabo la recolección de la *Portulaca oleracea*, para realizar la preparación de extractos a partir de sus hojas, tallo y raíz, simultáneamente se llevó a cabo un cultivo celular de las células HEP-2 y NHBE por un periodo de 7 días; se realizó a los 7 días de cultivo se realizó a los mismo la identificación de las características génicas y se le agregó a estos una combinación del extracto acuoso de tallo y hoja. Los efectos del extracto sobre el cultivo fueron valorados a los 3 días tras la exposición.

Resultados: A los 3 días de exposición al extracto, por microscopia óptica se evidencio en las células HEp-2 una disminución en el número de células, con pérdida de la homogeneidad en la distribución del cultivo y pérdida de la integridad de las membranas celulares con exposición de los componentes intracitoplásmáticos al medio extracelular.

Conclusión: Es posible que la muerte de las células HEp-2 se haya debido a componentes presentes en el extracto, por la cual se propone continuar con experimentos para seguir valorando los efectos de los extractos de *Portulaca oleracea* y sus características.

PALABRAS CLAVES:

Portulaca, Células NHBE, Células HEp-2, Diferenciación celular, Condrogénesis.

1. CAPÍTULO 1

1.1. Naturaleza del problema de investigación

La Osteoartrosis es la causa más común de Artritis con dolor articular, lo que lleva disfunción diaria de las personas (1). Actualmente la incidencia de esta patología es mayor y sigue en aumento debido a que no tiene una cura definitiva o un tratamiento que la enlentezca. Esto supone un problema tanto para los pacientes y médicos tratantes como para los farmacéuticos, quienes tienen el reto de desarrollar una terapéutica que detenga la inflamación del cartílago mientras se avanza en el proceso de desarrollar técnicas de laboratorio que faciliten y abaraten la renovación y diferenciación del cartílago previamente afectado (2). Una buena opción para conseguir tales técnicas es trabajar con células NHBE que son células indiferenciadas y HEp-2 que permiten hacer control del comportamiento de las células NHBE. Debido a esta característica, son particularmente atractivos para el objetivo de este proyecto ya que nos permiten cuantificar el proceso de diferenciación mediante marcadores específicos. Con un aumento en la población que envejece, hay un aumento concomitante en la necesidad de reconstrucción de tejidos, particularmente de etiologías posquirúrgicas y degenerativas como lo es la osteoartritis” (2). Sin embargo, para una adecuada diferenciación son necesarias sustancias capaces de inducirla. Por esa razón es necesario comprender los efectos que diferentes agentes químicos pueden llegar a tener sobre el proceso de diferenciación celular, ya sea modificando la fisiología de diversas proteínas intracelulares o induciendo al

avance o detención del mismo. Como sucede con los factores de crecimiento, que se encargan de regular la progresión del ciclo celular. La *Portulaca oleracea*, también conocida como verdolaga, es una planta que a nivel medicinal genera gran interés debido a los reportes que se han originado por sus efectos anti-inflamatorios, antioxidantes y con capacidad sanadora. En la literatura no existe evidencia de la utilización de *P. oleracea* en la inducción de la diferenciación de las células NHBE. No obstante, la bioquímica de la planta, así como la caracterización de sus polisacáridos y el efecto de sus extractos en los humanos la hacen ser considerada como un candidato ideal para estimular la expresión de marcadores celulares específicos de diferenciación, lo que abriría las puertas a la creación de nuevos medicamentos y opciones terapéuticas en una de las afectaciones con mayor incidencia a nivel mundial, como lo son la artritis y el desgaste de cartílago (3).

1.2 Formulación del Problema de Investigación

¿Cuál es la eficacia del extracto de *Portulaca oleracea* como inductor de la diferenciación de líneas celulares NHBE y HEp-2?

1.3 Justificación

Las terapias basadas en reemplazo celular e ingeniería de tejidos, apoyadas en las ciencias de nuevo auge como lo es la biología molecular, se están utilizando cada vez más como estrategias terapéuticas empleadas en diferentes patologías; el cartílago articular es una de las dianas empleadas en estos estudios de bioingeniería con el fin de generar nuevos tratamientos para el manejo de patologías reumáticas; en el caso de la osteoartritis se cuenta con medidas

biológicas tales como el uso de plasma rico en plaquetas, el concentrado de aspirado de médula ósea, el uso de células madres, el ácido hialurónico y el uso de aceite de pescado; y entre las medidas quirúrgicas asociadas a intervenciones biológicas contamos con el uso suplementación biológica cuando se presenta una fractura, el implante de condrocitos autólogos o inducidos en la matriz de la articulación, y la condrogénesis autóloga inducida en matriz(2), ahora bien el uso de condrocitos en estas estrategias terapéuticas es esencial, por ello cada día se busca inducir su producción y de esta manera apoyar el desarrollo de dichas medidas de tratamiento; actualmente encontramos estudios enfocados en la determinación de la eficacia de sustancias y compuestos químicas como inductores de diferenciación celular.

La proteína BMP-2, constituye un pilar en el proceso de inducción de condrogénesis, es decir actúa como agente diferenciador de células indiferenciadas hecho que ha sido demostrado en vitro y en vivo, las células diferenciadas se pueden identificar por la presencia de genes como el SOX, NANOG Y OCT(4), no obstante se ha tratado de determinar que otras dianas puedan estar involucradas o tienen una participación en este proceso de diferenciación celular, el Factor de Crecimiento Transformante Beta ($TGF-\beta_s$) induce la expresión de algunos genes, como el colágeno II, el glucano y también facilitan la construcción de glicosaminoglicanos, luego de haber logrado su aislamiento ha sido ampliamente utilizado en los proceso de bioingeniería relacionado con la producción de cartílago, la piascledina es un preparado herbal usado para aliviar las molestias causadas por enfermedades articulares; se comparó $TGF-\beta_s$ con piascledina en relación a determinar in vitro si este último tenía un papel en la inducción del proceso de condrogénesis, decir diferenciación celular, se demostró que puede aumentar significativamente la proliferación y la supervivencia de células diferenciadas con una $P=0.045$, así mismo cuando se

usan juntos la Piasclidina con TGF $-\beta$ s se evidenció también un aumento de la proliferación en comparación con usar TGF $-\beta$ s solo ($P=0.045$), teniendo en cuenta que se consideraba estadísticamente significativo una $P < 0.05$ (5).

La efectividad de la piasclidina en inducir el proceso de condrogénesis, como un tipo de diferenciación se debe a que es capaz de mejorar la supervivencia de las células, promueve la reparación del cartílago, su efecto condroprotector, anabólico y las propiedades anti- catabólicas (3); teniendo en cuenta que la piasclidina es un extracto natural se quiere valorar también el papel que podría tener el extracto a base *Portulaca oleracea* en este tipo de diferenciación debido a ese papel antiinflamatorio que posee cuando es utilizada como ungüento por los pacientes para el tratar el dolor, la inflamación y la incapacidad generada por las enfermedades articulares (6). La eficacia de la actividad antiinflamatoria y analgésica de la *Portulaca oleracea* ha sido demostrada por varios estudios, en 2012 S. Cáseres y L. Maricela (7) aplicaron diferentes dosis de un extracto etanólico de *Portulaca oleracea* 15 ratas albinas en las cuales se había inducido un proceso inflamatorio, a ellas se las sometió a 5 tratamientos y se demostró que el extracto etanólico a dosis de 500g/Kg mostró una efectividad similar a la indometacina hasta las 5 horas (7), la actividad analgésica es aportada por las hojas y se evidencia al evaluar un extracto etanólico al 95% que fue administrados a ratones a la dosis de 1g/Kg (8).

Los tratamientos utilizados actualmente de manera universal para la osteoartritis u artritis incluyen analgésicos antiinflamatorios no esteroideos, corticoides, ácido hialurónico y fisioterapia, no obstante ninguno parece frenar la progresión de la enfermedad de ahí por qué querer avanzar en las investigaciones relacionadas con células madre para así proponer mejor alternativas de tratamiento que influyan positivamente en la vida de los pacientes(8), el querer disminuir la progresión de la enfermedad radica en el alto grado de discapacidad que causa

en la población que la padece sobre todo cuando esta afecta las articulaciones de la cadera y rodilla pues son las que más discapacidad causan (9), además la artrosis afecta a una gran densidad poblacional, puesto que el 95% de la población adulta la padece y solo un 5% se presenta en personas jóvenes (10), esto es debido a que la edad avanzada es uno de los factores de riesgo que más se ha encontrado asociado, la prevalencia de esta enfermedad en personas entre los 25 a 34 años es alrededor de 0.1% en comparación con la personas mayores de 55 años donde la tasa es del 80%, por otro lado es una enfermedad que afecta mayoritariamente a la mujeres en una relación de 11.4% mujeres vs 6.8% hombres (3-11).

El uso de estas intervenciones lograría también disminuir la incidencia de las enfermedad articulares al ser aplicadas previamente en personas que cuentan con factores de riesgo, se estima que alrededor de 3 millones de personas padecen artrosis, y en América Latina la prevalencia es del 7,3% (10); en Estados Unidos más de 50 millones de adultos padecen artritis y entre las más comunes se encuentra la osteoartritis, siendo la causa más común de discapacidad, los costos anuales que implican gastos médicos y pérdidas de ingresos, superan los mil millones de dólares y el gobierno gasta al menos 81 mil millones de dólares al años en gastos médicos directo (10).

En Colombia se realizó un estudio en el cual se utilizó la estrategia epidemiológica Community Oriented Program for Control of Rheumatic Diseases (COPCORD), la cual permitía la identificación de pacientes con síntomas osteo-musculo-articulares de origen no traumático, en él se incluyeron 6.693 personas y participaron las ciudades de Bogotá, Cali, Medellín, Barranquilla, Bucaramanga y Cúcuta , se evidencio que la osteoartritis es la enfermedad reumática más prevalente (10,81%; IC 95% 9,68 - 12,06%) , sin embargo el dolor lumbar en la ciudad de Barranquilla fue más frecuente con una prevalencia del

11,91% (12). Es importante tener en cuenta que no existen en Colombia datos epidemiológicos generales de la carga de osteoartritis, así como tampoco datos acerca de los costos generados de manera directa e indirecta por ella (3).

La Organización Mundial de la Salud respalda el uso de plantas en la elaboración de medidas que estén involucradas en la mejora de la calidad de vida de las personas, y disminución de la incidencia de patologías, esto es debido a que la medicina tradicional es una parte importante del sistema de salud y el uso de ellas bien sea de manera directa e indirecta viene en aumento; este respaldo otorgado por la OMS se evidencia en la creación futura de una base de conocimiento universal acerca de la medicina tradicional, la reglamentación de productos y prácticas que garanticen una utilización segura, de calidad y por supuesto eficaz, por último que el uso de Medicina Tradicional sea una cobertura sanitaria universal a la que todos puedan acceder (13).

En contraposición a lo indicado por la OMS, a pesar de que la biología molecular, genética e inmunología han permitido el desarrollo de nuevas medidas terapéuticas que se han implantado en el campo de la reumatología con el fin de mejorar las condiciones del paciente que padece alguna patología reumática, favorecimiento que se mide a través de la mejora en la calidad de vida que experimenta el individuo y de los síntomas; el uso de estas medidas demanda un costo enorme y constituye el problema más grande, ya que el uso indiscriminado de los mismos puede consumir el capital económico del sistema de salud de un país, por tal motivo dentro de cada uno de los países se establecen normativas que hacen hincapié en el adecuado uso de estas medidas, en Colombia la aplicación juiciosa de la normativa refleja que por ejemplo para el caso de artritis reumatoide de los 250000 enfermos con los que se cuenta solo 600 reciben medidas terapéuticas de este tipo, luego de llevar ya 4 años en el mercado; básicamente se quiere mostrar que esta nueva alternativa de tratamiento que se

pretende estipular si bien se acepta que sería costosa esto no impediría su uso, más sin embargo si se establecería medidas que indiquen cuándo y quiénes se debe implementar (12).

Ver Anexo 1: Árbol del Problema

1.4 Objetivo General

Determinar la eficacia del extracto de *Portulaca oleracea* como inductor de la diferenciación de las líneas celulares NHBE y HEp-2.

1.5 Objetivos específicos

- Evaluar el crecimiento y la viabilidad de los cultivos celulares previo a la aplicación del extracto
- Cuantificar los marcadores moleculares para las líneas celulares NHBE y HEp-2.
- Evaluar la actividad inductora de diferenciación celular del extracto obtenido a partir de *Portulaca oleracea*.

1.6 Propósito

El desarrollo de éste diseño de investigación permitirá la obtención de marcadores específicos de diferenciación utilizando como inductor los extractos de la *Portulaca oleracea*, a través de las técnicas de biología molecular, proponiendo un nuevo compuesto de tipo natural que permita la inducción de diferenciación celular, células que puedan llegar a ser utilizadas como complemento de las alternativas terapéutica en el tratamiento de enfermedades prevalentes y crónicamente degenerativas relacionadas con el desgaste de cartílago teniendo en cuenta a la

condrogénesis como un tipo de diferenciación celular.. Todo esto con el fin de encontrar cimientos para apoyar las nuevas medidas terapéuticas empleadas en este tipo de enfermedades, que buscan mejorar en la calidad de vida de las personas afectadas por éste fenómeno

2. CAPÍTULO 2

2.1 Marco Teórico

2.1.1 *Portulaca oleracea*

La *Portulaca oleracea* (PAes una planta herbácea puede alcanzar hasta los 40 cm de alto, de tallos lisos rojizos, que en su mayoría se extienden paralelos al suelo) (14-18) . Sus hojas son verdes alternadas presentes a lo largo del tallo y en su extremo. Sus flores son amarillas, se ubican en el centro del manojo de hojas del extremo. Se distribuye ampliamente en zonas tropicales y subtropicales.

Es una planta que ha sido utilizada como remedio terapéutico desde la antigüedad, en el siglo XVI Francisco Hernández afirma se la ha aplicaba para curar el dolor de cabeza, a sí mismo Gregorio López un siglo después indica que además también es útil para la inflamación de los ojos, dolor de estómago y en el siglo XVIII, Juan de Esteyneffe menciona ser una medida terapéutica adecuada para tratar aftas, melancolía, hematuria, entre otras enfermedades de la época.

La composición química de la planta es a base de agua puesto que lo conforma el 95% de la planta, por otro lado, contiene también diversos alcaloides fenólicos que son los encargados de darles las actividades antioxidantes. En la planta se puede

encontrar mediadores químicos como dopamina y noradrenalina, sin embargo, las concentraciones son muy bajas. Los ácidos grasos se pueden encontrar en todas las estructuras de la planta siendo más abundante en la semilla (8).

Según varios estudios esta planta tiene varias utilidades en medicina, tanto que ha llegado a ser catalogada como una verdadera panacea (14). Las propiedades demostradas de PA son: neuroprotectoras, antimicrobianas, antidiabéticas, antioxidantes, anti-inflamatorias y anti-ulcerogénicas (19). L. Santamaría en su tesis de grado publicada por la escuela de bioquímica y farmacia de Ecuador en 2011 planteó el efecto analgésico y antiinflamatorio del extracto etanólico que se produjo a partir de la planta, para evidenciar este efecto se tomaron 15 ratas albinas a las cuales se le indujo un proceso inflamatorio, ellas fueron sometidas a 5 tratamientos: tratamiento 1: agua destilada, tratamiento 2: Indometacina, tratamiento 3: 250mg/kg del extracto, tratamiento 4: 350 mg/kg, tratamiento 5: 500 mg/kg, los efectos fueron medidos subjetivamente cuantificando la velocidad con que se redujo el edema en 7 horas, el extracto etanólico a dosis de 500g/Kg mostró una efectividad similar a la Indometacina hasta las 5 horas, sin embargo transcurrido el tiempo perdió su efecto (7).

Por su parte, Lidia Guzmán et. al publicaron un artículo en 2017 en la revista cubana de farmacia en donde exponen las propiedades antiinflamatorias de un extracto etanólico de *Portulaca oleracea* en 3 grupos de ratas Wistar utilizando como control el Naproxeno sódico, en donde, finalmente se concluyó que el extracto tiene un buen efecto antiinflamatorio a las 2 horas y que la planta tiene principios activos que la hacen candidata para emplearla como agente antiinflamatorio en humanos (20).

Es importante además también conocer las características de las células madres, estructuras donde se evidenciará estas propiedades propias de la P.O. a nivel molecular cuando sean expuestas al extracto que se producirá a partir de dicha planta, a continuación, se describen aspectos relevantes relacionados con las células madres

2.1.2 Células normales de epitelio bronquial (NHBE)

Las líneas celulares son cultivos celulares con alta capacidad de multiplicarse in vitro (21), normalmente tienen una vida finita, que dependen del tipo de célula utilizada (22). En 1948, Earle, et al., aislaron células de una línea celular y demostraron la capacidad de formar clones en el cultivo de tejidos, dejando claro el potencial de estas para diferenciarse y su beneficio para futuras investigaciones (22).

Las células epiteliales humanas normales (NHBE), al ser células primarias de origen bronquial, es decir, que son tomadas directamente de tejido vivo y generalmente han sufrido muy pocas duplicaciones (23), proporcionan un sistema de análisis representativo del estado in vivo. De manera que, esta línea celular ha sido utilizada en múltiples estudios experimentales, por ejemplo, en el año 2005, Wanda R. Fields, et al., publicaron un estudio llamado “expresión génica en células epiteliales bronquiales humanas normales (NHBE) después de la exposición in vitro al humo condensado de cigarrillo” que ha permitido entender el comportamiento de las células epiteliales ante la exposición de contaminantes ambientales comunes (24).

Estas células se encuentran en un estado indiferenciado lo que les proporciona la característica especial que las hace excelentes candidatas para nuestro proyecto, ya que, expresan marcadores moleculares específicos que nos permiten

cuantificar el proceso de diferenciación. Precisamente determinar si la *Portulaca oleracea* se comporta con inductor de diferenciación en la línea celular NHBE es lo que se quiere poner en evidencia a lo largo de este proyecto, sin embargo, es importante conocer acerca de aquellas moléculas que ya tienen identificado un papel en este proceso. A continuación, mencionaremos aspectos relevantes acerca de la caracterización genética de ésta línea celular.

2.1.3 Descripción genética de células NHBE

En las células NHBE podemos encontrar diferentes proteínas encargadas de la regulación del ciclo y vida celular, así mismo aquellas proteínas y mecanismos asociados a detección de daños y reparación de ellos mismos. En un estudio donde se expusieron las células a humo de cigarrillo condensado (CSC) se encontró que el daño al ADN, más específicamente al gen GADD45 que codifica para un grupo de proteínas también llamadas GADD45 implicadas en detectar y regular mecanismos de estrés, aumentan su expresión y regulan el ciclo celular al interactuar con la proteína p21, permitiendo estar a la célula durante más tiempo en la fase mitótica S, fase caracterizada principalmente por la duplicación del ADN y centriolos (25). Por otro lado, en otro estudio donde también se evaluó el efecto de CSC en estas células, se encontró un incremento de la masa mitocondrial y contenido de ADN mitocondrial como respuestas a los procesos de estrés oxidativo, siendo este cambio un estímulo o un trigger permitiendo un aumento de la permeabilización de la membrana mitocondrial y liberándose así al espacio citoplasmático proteínas como smac/DIABLO, citocromo C y Serina proteasa HtrA2/Omi, dando lugar a la vía de muerte celular programada o apoptosis (26). Además, se encuentran reportadas en grande cantidad el Factor Nuclear- κ B (NF- κ B) Factor que regula funciones innatas y adaptativas del sistema inmune y actúa en la respuesta inflamatoria al igual que la COX-2, IL-2, IL-4, IL-6,

IL-8, IL-10 y TNF- α encargados principalmente de la respuesta inflamatoria (25-26).

2.1.4 Célula de carcinoma epidermoide humano cepa 2 (HEp-2)

Éstas líneas celulares son un tipo particular de células de cultivo neoplásicas inmortalizadas (27).

Etimológicamente hablando el nombre de la línea celular “human epidermoid carcinoma strain 2” (HEp-2) procede del comportamiento que muestran una vez cultivadas, similar a un carcinoma epidermoide, a lo que se le suma el número de cepa, en este caso 2. Hasta hace un par de años se tenía la creencia que estas células originales provenían de un tumor metastásico nodular de laringe; extirpado en el año 1952 de un paciente masculino de 57 años de edad que padecía cáncer de garganta. La realidad es que las células removidas por métodos quirúrgicos fueron posteriormente implantadas en ratas inmunosuprimidas para finalmente establecer el cultivo de las mismas. Con lo anterior se pudo confirmar que tiene la característica de ser metabólicamente activas lo que favorece su cultivo (27).

Es importante comentar de ellas que en las investigaciones más recientes se ha demostrado que contienen marcadores cromosómicos de la línea celular HeLa por lo que se cree que son derivadas de dicha línea celular (38).

Actualmente, juegan un papel fundamental en el diagnóstico de enfermedades autoinmunes por el método técnico de inmunofluorescencia indirecta para la detección de anticuerpos antinucleares, es decir, el ensayo sobre células HEp-2 es el método de cribado recomendado debido a que es capaz de hacer diagnóstico diferencial entre este grupo de enfermedad y, además, con una alta sensibilidad, aunque baja especificidad (28).

2.1.5 Descripción genética células HEp-2

Un estudio en donde las células HEP-2 fueron infectadas con Virus Sincitial Respiratorio (VSR) se comparaban la expresión genética y actividad proteica que intervenía en dos posibles resultados, células HEP-2 persistentes y células HEP-2 Líticas, a diferencia de las anteriores, estas últimas morían por apoptosis. Dependiendo de la cantidad de inocuo de VSR, proteínas de superficie expresada y daños a la membrana celular, se activan diferentes mecanismos que pueden llevar a los distintos linajes mencionados previamente, siendo así, en el linaje de células HEP-2 Persistentes se evidencia mayor participación de los factores anti oncogénicos y una sobre expresión de integrinas, glicoproteínas asociadas a la adhesión celular y de la matriz extracelular, cuando el inocuo y los factores de estrés celular son mínimos o no superan los mecanismos de defensa celular. Por otro lado, en el linaje de células HEP-2 Líticas, se encontró que la sobreexpresión de proteínas no estructurales del VSR junto a otros factores contribuyen a la activación de la vía PI3K/AKT/NF- κ B dando como resultado la apoptosis o muerte celular programada (30).

2.1.6 Regulación de la pluripotencialidad y diferenciación

Las células madres o “Stem Cells” requieren cierto grupo de factores intrínsecos que cooperan en procesos de transcripción y epigenética necesarios para ser células pluripotenciales y que jueguen a su vez un papel decisivo en cuanto la diferenciación y regulación de esta misma. Entre los diferentes factores se incluyen OCT4, SOX2, c-MYC, KLF4, NANOG y LIN28, siendo OCT4 y SOX2 críticamente requeridos para la pluripotencialidad de la célula. Estos factores juegan un papel complejo donde terminan regulando la expresión de Locis necesarios para la pluripotencialidad y diferenciación celular. Por otro lado, en cuanto a los factores epigenéticos se han encontrado controversias en distintas vías, una de ellas en favor de la diferenciación celular promovida por OCT4, SOX2

y NANOG y la otra por medio de metilación implicada en “silenciar” los genes o la transcripción de ellos, impidiendo o retrasando el proceso de regulación de la diferenciación celular (31).

CD146 también conocido como glicoproteína de superficie celular MUC18 es codificada por el gen MCAM y hace parte del grupo de moléculas de adhesión celular, se cree que es expresada inicialmente en células de la cresta neural en sus uniones intercelulares, pero posteriormente se encuentra en toda la economía corporal. (31-32)

Recientemente se ha vinculado a actividad en el desarrollo celular, transducción de señales, migración celular, diferenciación de las células mesenquimales, angiogénesis y respuesta inmune. (33)

Esta amplia distribución del receptor y su participación en diversas rutas de comunicación celular la hacen un candidato perfecto para identificar grupos celulares pobremente diferenciados, sobre todo si son de origen mesenquimal, ya que estas requieren más uniones intercelulares.

El gen ACTB, también llamado BRWS1 y PS1TP5BP1 codifica para la B-actina, una proteína fundamental en el citoesqueleto que sostiene la forma al interior de las células, esto le da funciones en la movilidad celular, estructura, integridad y señalización celular. Debido a lo indispensable de sus funciones este gen se encuentra presente en todas las células del organismo, lo que lo hace un excelente candidato para reconocer la actividad y viabilidad de un cultivo celular. (34-35)

2.1.7 Preparación de los insumos necesarios para la inducción del proceso de diferenciación.

2.1.7.1 Cultivo y seguimiento

Cultivo de HEp-2

Se prepararon 40 ml de medio de cultivo conformado por suero fetal bovino, anfotericina, penicilina y DMEN. Se descongelaron las células HEp-2 que se encontraban a menos 80°C y se transportaron a caja de frío. Se tomaron partes iguales de DMEN suplementado y de células HEp-2 para completar el volumen total en un pozo celular, luego se incubó a 37°C con 5% de Co₂ por 7 días.

Cultivo de células NHBE

Se tomaron las células NHBE que se encontraban a menos 80°C y se pasaron a una caja de frío, luego se llevaron a cabina de bioseguridad donde se tomaron partes iguales de BEGM para conseguir el volumen final, luego se centrifugó y el precipitado se mezcló con el medio BEGM, esto se agregó a una mini caja de petri, y se llevó a incubadora a 37°C con 5% de Co₂ por 7 días.

Se realizó vigilancia de su viabilidad cada dos días y cambio de cultivo a los 4 días.

2.1.7.2 Preparación del extracto

Las partes aéreas de la planta deben ser recogidas especificando la fecha y el lugar para garantizar la reproducibilidad del método. Así mismo y por la misma razón se debe mencionar el lugar y la temperatura a la que son almacenadas. Se dejan secar al aire y se pulverizan. Luego se agrega 6 veces el volumen de agua hirviendo respecto al peso de la planta y se deja por 3h en continua agitación. Se

repite el proceso dos veces. El extracto acuoso resultante se filtra con papel filtro mili poro de 0,45 μm . Se concentra a seco con un evaporador rotatorio a $50 \pm 1^\circ\text{C}$ para dar residuos sólidos.

En un estudio realizado por Zhao et. al, en el que determinaban los efectos de los polisacáridos en la diferenciación de células dendríticas de médula ósea de ratón, extrajeron dichos carbohidratos por cromatografía (18).

El método utilizado por K. Chan et. al en donde extrajeron un extracto etanólico al 10% fue: Recolección de la planta y especificación del lugar con referencia numérica del espécimen. Se lavaron para quitar los residuos de tierra, se separaron las hojas de los tallos y se pusieron sobre hojas de papel filtro en un lugar seco, a la sombra y a 25°C . Se dejaron por 13 días hasta que se secaron. Las partes aéreas secas se aplastaron en un molino y se almacenaron hasta su uso.

Para la preparación del extracto alcohólico se pesaron las partes secas en un matraz de fondo redondo equipado con condensador y un manto calentado. Todo el contenido se mezcló con etanol acuoso a 10% v/v por 4 h. La solución resultante se filtró con papel filtro Whatman No. 1 y el residuo se mezcló otra vez en con etanol 10% como se describió arriba. Una vez obtenidas las dos soluciones se redujeron en un evaporador Buchi bajo presión reducida. El extracto se puso en platos tarados, se secaron en un baño de agua y luego en un horno vacío a 40°C . El resultado se mantuvo en secador de vacío hasta su uso (9).

Es importante también identificar las características del extracto antes de ser aplicado al cultivo de células madres, este proceso es explicado posteriormente.

2.1.8 Eficacia

La Real Academia Española, define eficacia como esa capacidad de lograr el efecto que se desea o espera (36).

H. David Banta (37) en su artículo *The Concepts of Efficacy and Safety* lo define como la probabilidad de beneficio en un grupo de individuos de una determinada población debido a la aplicación una nueva medida terapéutica en un problema médico, siempre y cuando se utilice en las condiciones adecuadas; es decir que la eficacia de una tecnología se puede evaluar solo en relación con la enfermedades o condiciones médicas para las cuales se aplica.

En economía, la eficacia es esa capacidad de poner obtener las metas u objetivo de un proyecto o actividad en específica, sin tener en cuenta la cantidad de recursos económicos invertidos en su ejecución (38).

En nuestro estudio el extracto de *Portulaca oleracea* será eficaz como inductor de la diferenciación si por medio de la técnica de RT-PCR, se logra evidenciar la presencia de ARNm de los marcadores característicos de las células diferenciadas (*SOX2*, *NANOG*, *OCT*), por sobre los niveles de expresión génica basal encontrados en los cultivos de células antes de agregar los extractos.

3. CAPÍTULO 3: METODOLOGÍA

3.1 Tipo de estudio

Este proyecto está enmarcado como un estudio experimental de laboratorio cuyo objeto de estudio son las células NHBE y HEP-2 y la probabilidad de diferenciarse en condrocitos por acción de los factores químicos presentes en los extractos de la planta silvestre *Portulaca oleracea*.

3.2 Procedimiento

El desarrollo de este trabajo estuvo constituido por 3 fases:

- **Fase de obtención y preparación de los insumos:** necesaria para llevar a cabo el proceso de inducción de diferenciación, a su vez esta se dividió en 3 momentos:
 - Preparación del cultivo celular de las células HEP-2 y NHBE y seguimiento de su crecimiento y proliferación.
 - Recolección de la *Portulaca oleracea*
 - Preparación de los extractos a partir de la *Portulaca oleracea*
- **Fase de análisis de los cultivos celulares y los extractos de *Portulaca*:**
Se llevó a cabo la caracterización del perfil químico de las células previo a aplicación del extracto de *Portulaca oleracea*.
- **Fase de prueba y evaluación de los efectos de los extractos de *Portulaca oleracea*:**

Consistió en agregar los extractos de portulaca a los cultivos de HEP-2 y NHBE y a los 7 días para determinar si los extractos eran o no efectivos induciendo diferenciación celular.

Ver anexo 2:Esquema del procedimiento

3.2.1 Fase de obtención y preparación de los insumos necesarios para llevar a cabo el proceso de inducción de diferenciación.

3.2.1.1 Preparación del cultivo celular de HEP-2 y NHBE y seguimiento de su crecimiento y proliferación.

Cultivo de HEp-2: Se prepararon 40 ml de medio de cultivo conformado por 6 ml de suero fetal bovino al 15%, 400 µl de anfotericina, 800 µl de penicilina y 34 ml de DMEN, para que de esta manera se obtenga un medio de cultivo suplemento de volumen final de 40ml.

Se descongelaron rápidamente las células HEp-2 que se encontraban previamente refrigerada a menos 80 grados centígrados garantizandose cadena de frío. Se tomaron 500ul de cultivo (DMEN suplementado) y 500 ul de células HEp-2 para completar 1 ml de volumen en total en un pozo celular, luego se llevó a incubadora a 37°C y 5% de CO₂ por 7 días.

Cultivo de células NHBE: Se tomaron las células NHBE que se encontraban refrigeradas a -80 ° C y se pasaron a una caja de frio para almacenar, luego se retiraron de la caja de frio y se llevaron a cabina de bioseguridad donde se pipetea y se toman 500 ul, esto se mezcló con 500 ul del medio de cultivo BEGM para un volumen final de 1 ml, luego se centrifugó por 5 minutos a 2500 rpm, se descartó el sobrenadante y el precipitado se mezcló con 2 ml del medio BEGM, se tomó 1 ml y se agregó en una mini caja de petri, con el mililitro restante se llevó a cabo el mismo procedimiento, por último se llevó a incubadora a 37 grados centígrados y 5% de CO₂ por 7 días.

Se realizaba vigilancia de su viabilidad cada dos días y se realizó cambio de cultivo a los 4 días.

Una vez se finalizó el proceso de preparación de los cultivos celulares y estos fueron colocados en incubación, se siguió con la siguiente etapa del procedimiento, que era la obtención de los extractos de *Portulaca*.

3.2.1.2 Recolección de la muestra de *Portulaca oleracea*.

Durante el tiempo en el cual las células crecieron se realizó una salida de campo para recolectar plantas de *Portulaca oleracea* en zonas costeras colombianas, en nuestro caso, las zonas costeras de Puerto Colombia y alrededores. Las plantas recolectadas fueron lavadas con abundante agua y secadas a temperatura ambiente. Luego se procedió a deshojar las plantas recolectadas al igual que se separan los tallos y raíces. Cada uno de los tipos de muestras (hojas, tallos y raíces) se pesaron en una balanza analítica y se tomaron las mismas cantidades (100 gramos).

Con la planta dividida en sus partes principales se procedió con la obtención de los extractos acuoso y etanólico de *Portulaca oleracea*.

3.2.1.3 Preparación de los extractos vegetales de *Portulaca oleracea*.

El proceso de extracción fue realizado por medio de maceración con mortero. Con un mortero se redujeron mecánicamente las distintas partes de la planta (tallos, hojas y raíz) a porciones más pequeñas en 20 cc de agua mili Q.

Los extractos obtenidos del procedimiento fueron filtrados en gasa estéril y el extracto líquido se refrigeró a 4°C para ser utilizado en los cultivos celulares. Todo el procedimiento de obtención de los extractos fue realizado en un ambiente controlado a 20°C para evitar la degradación de los componentes de la planta, los cuales pueden ser afectados por acción del calor y los procesos mecánicos.

Una vez se finalizó este proceso ²⁹ se llevó a cabo la identificación de las características químicas de la portulaca y de las células.

3.2.2 Análisis de los cultivos celulares y los extractos de *Portulaca*.

3.2.2.1 Caracterización del perfil génico de las células madres previo a la exposición al extracto mediante RT-PCR

Previamente a la caracterización génica se llevó a cabo un pasaje celular que consiste en la separación del medio de cultivo celular inicial en varios medios con el fin de obtener mayor cantidad de material.

A los siete días de incubación se tomaron las células previamente almacenadas en la incubadora, inicialmente se determinó la confluencia celular luego los cultivos celulares fueron transportados a la cabina de bioseguridad la cual fue previamente esterilizada mediante luz ultravioleta por 45 minutos

Para el pasaje de las células NHBE se descartó el sobrenadante del cultivo celular, al precipitado del cultivo se le agregó 2,5 ml de tripsina y a su vez 2,5 ml de tampón PBS para detener la reacción de misma, se tomaron 5 ml del cultivo y se pasaron a tubo Eppendorf y centrifugó por 8 minutos a 2500 rpm se descartó el sobrenadante y se le agregó al precipitado 4 ml de medio de cultivo (BEGM) y se mezcló por pipeteo, se tomaron de esta mezcla 3 ml y se pasó 1 ml a cada uno de las cajas de petri para el nuevo cultivo (3 cajas, se utilizan 3ml), se dejó 1ml que fue utilizado como muestra para el proceso de extracción de ARN total y análisis mediante RT-PCR, para ello se llevó a cabo el protocolo estandarizado del kit ARN total extraction for blood cell by Thermofisher Scientific.

Para el pasaje células HEp-2 se llevó a cabo el mismo procedimiento, sin embargo, el medio de cultivo empleado para estas fue el DMEM suplementado. Al final el mililitro restante también fue utilizado para realizar el proceso de extracción de ARN total y análisis mediante RT/PCR igualmente se hizo través del protocolo estandarizado del Kit de ARN Total Extraction for Blood Cell by Thermofisher Scientific.

En esta caracterización genética permitió amplificar la presencia de los genes específicos de diferenciación (SOX, NANOG y OCT4) y de marcadores moleculares que indican la presencia de expresión génica significativa por parte de

las células (B-actina y CD146); es importante tener en cuenta que, si bien se siguió un protocolo establecido para la RT/PCR, la ejecución se llevó a cabo por medio de 4 ciclos que se realizaron de la siguiente manera: el primer ciclo se realizó una sola vez y tuvo una duración de 43 minutos. Durante los primeros 23 minutos se manejó una temperatura de 55°C y en los últimos 20 minutos una temperatura de 72°C. En la segunda fase se realizó la PCR en 35 ciclos con una duración total de 90 minutos; la etapa de desnaturalización se realizó a 94°C; anillamiento a 60°C y extensión a 72°C. La reacción se mantuvo a 72°C por 5 min para finalmente terminar a 4°C por tiempo indefinido. Se aclara que para el caso del gen NANOG la temperatura de anillado fue de 65°C.

Para identificar la concentración y pureza de material genético previo a la visualización de los genes a través de un corrido electroforético, se realizó espectrofotometría a 280 nm y 260 nm, y para determinar la pureza del material se verificaron con los índices de absorbancia a 260/280 nm y 260/230 nm. Se consideró de pureza óptima las muestras de ADN y ARN con índices que oscilaran entre [1.8-2.0] y [2.0-2.2] para A_{260/280} nm y de [1.5-2.2] para A_{260/230} nm respectivamente. El corrido electroforético se realizó en gel de agarosa empleando un gel de agarosa al 3.5% y se utilizó un voltaje de 100V y 60mA por un tiempo de 1 hora; la visualización del mismo se llevó a cabo en un fotodocumentador con luz UV y cámara integrada, que utiliza el software Image Lab.

3.2.3. Prueba y evaluación de los efectos de los extractos de *Portulaca oleracea*

3.2.3.1 Exposición de los cultivos c 31 res a los extractos de *Portulaca*

A los cultivos celulares que se han mantenido en crecimiento durante al menos 7 días se le aplicó una mezcla de los extractos acuosos de hojas y tallo de *Portulaca oleracea* a una concentración de 0.5%, se les realizó seguimiento a las 72 horas

al crecimiento celular y cualquier tipo de observación macro o microscópica fue detallada en la bitácora de trabajo.

Los cultivos serán posteriormente evaluados una vez más mediante la RT-PCR, para poder determinar la eficacia de los extractos de *Portulaca*.

3.2.3.2 Evaluación de la inducción de diferenciación en las células madres luego de la exposición al extracto mediante RT-PCR

A los 7 días de haber agregado los extractos de *Portulaca* se evaluará el efecto de los extractos en el proceso de diferenciación. Para ello se realizará un análisis de cuantificación y determinación de ARNm mediante la utilización de membranas cargadas con oligodT, síntesis de cDNA de 2 microlitros por transcripción reversa y cuantificación de ADN mediante una RT-PCR.

Al evaluar la diferenciación se dispondrá a considerar eficaz como inductor del proceso de diferenciación la evidencia por medio de la RT-PCR la expresión de ARNm de los marcadores moleculares típicos de diferenciación. La presencia de estos marcadores es característica de células diferenciadas, al comparar los perfiles génicos previo y posterior a la utilización de los extractos, no deben de ser encontrados en el perfil genético basal de las células NHBE previo a la utilización de los extractos de *Portulaca*.

Control positivo

Como control positivo se utilizó un cultivo de NHBE

Control negativo

Como control negativo se utilizó un cultivo de células HEP-2

3.3 Procesamiento de Datos

El crecimiento y proliferación del cultivo celular de las NHBE y de las HEp-2 y los datos referentes a este proceso de crecimiento fueron obtenidos mediante la observación en microscopio confocal cada 72 horas durante los 7 días que se esperaba se desarrollara la proliferación de las dichas células.

Los datos encargados de determinar si el proceso de diferenciación de las células llegó a desarrollarse o no iban a ser obtenidos mediante de la captación del ARNm el cual se iba a adquirir a través de las membranas cargadas de oligodT y las secuencias de ARNm que iban a ser cuantificadas y analizadas por medio de la técnica de qPCR.

3.4 Presentación y análisis de resultados

Los resultados obtenidos del crecimiento del cultivo celular se muestran gráficamente mediante imágenes de las colonias celulares que se fueron formando durante los 7 días de cultivo.

Por otro lado, las secuencias de ARNm obtenidos de las células luego de que se les agregó el extracto de *Portulaca oleracea* iban a ser comparadas con secuencias de ARNm establecidas en las bases de datos del National Center for Biotechnology Information (NCBI), para de esa manera determinar si se había logrado o no algún cambio en el patrón de expresión génica (gradiente de expresión de proteínas) en las células.

4. CAPÍTULO 4. RESULTADOS

4.1 Evaluar el crecimiento y la viabilidad de los cultivos celulares previo a la aplicación del extracto

Se realizó seguimiento con microscopio óptico a los cultivos celulares, con el fin de determinar la correcta evolución de los mismos y advertir de manera oportuna cualquier inconveniente que pudieran presentar. Las siguientes imágenes corresponden a la observación de los cultivos de HEP-2 los días 1, 3 y 7 de cultivo:

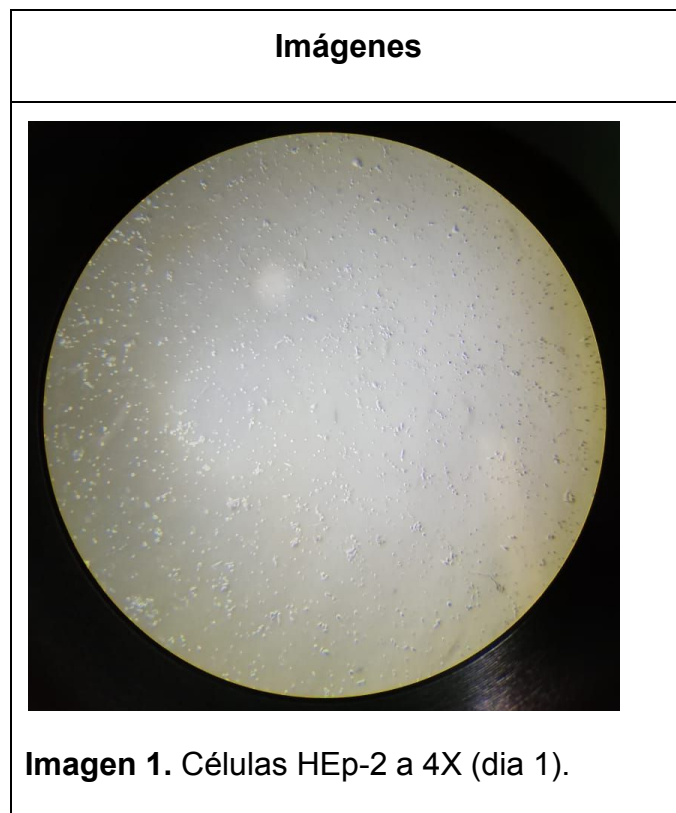




Imagen 2. Células HEp-2 a 4X (Dia 3)

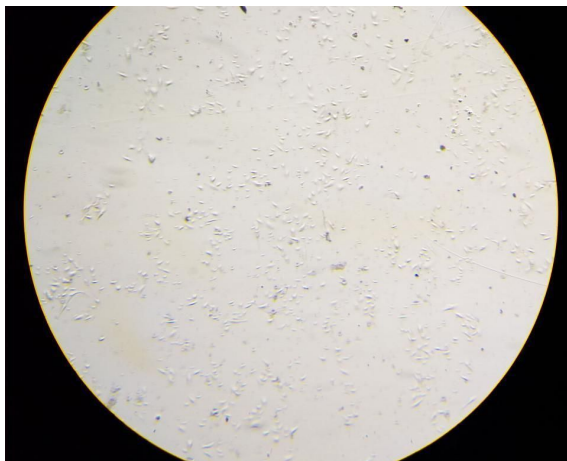


Imagen 3. Células HEp-2 a 4X (dia 7)

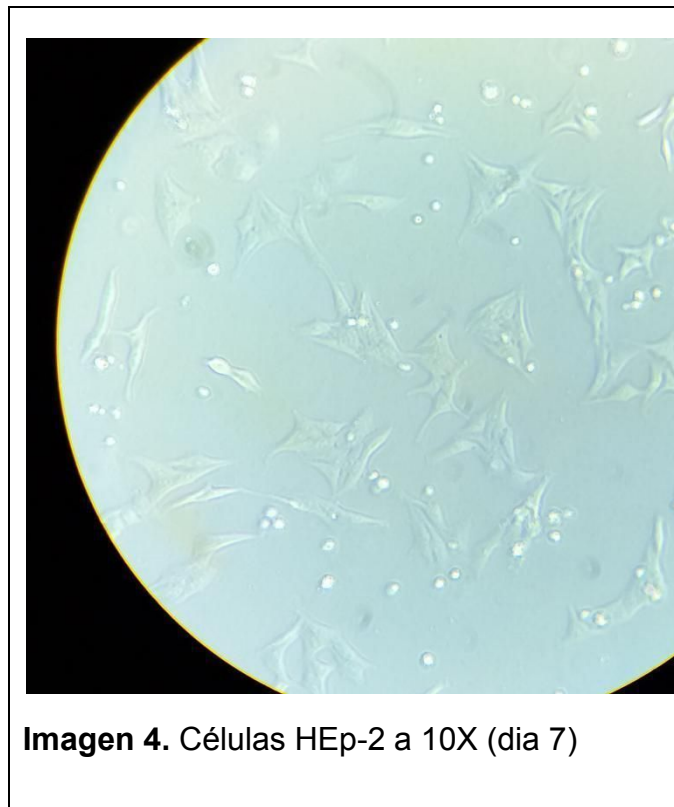


Imagen 4. Células HEp-2 a 10X (día 7)

En la imagen 1 se observan colonias celulares tipo fibroblásticas sembradas en el medio de cultivo Dulbecco's Modified Eagle Medium (DMEM) suplementado con suero fetal bovino, distribuidas de manera homogénea en monocapa el primer día de cultivo. En la imagen 2 se aprecia el mismo cultivo al tercer día, donde se nota un aumento de la celularidad respecto al primer día. En las imágenes 3 y 4 se observan mantenimiento de los números celulares al séptimo día de cultivo respecto al tercero.

4.2 Caracterización génica de las líneas celulares NHBE y HEp-2

Se realizó control de calidad de las muestras obtenidas de ADN y ARN extraído de las células de los cultivos de NHBE y HEp-2 antes de agregar el extracto de

Portulaca oleracea por medio de espectrofotometría, para determinar la concentración y la pureza de las mismas. A una absorbancia estándar de 260 nm se obtuvo un ARN total en las células NHBE de 795,6 ng/dl y de 237,8 ng/dl para las HEp-2 y con las relaciones de absorbancia a 260/280 para HEp-2 y NHBE de 2.09 y 1.87 y a 260/230 para HEp-2 y NHBE de 2.01 y 2.32 se verificó que las muestras eran de una pureza óptima con excepción del ARN de NHBE que reportó una pureza aceptable acorde a su índice de absorbancia a 260/230 nm. Todas las muestras de ADN obtuvieron una pureza óptima en la prueba A continuación se muestran los resultados de la espectrofotometría:

Espectrofotometría de ADN y ARN.

Imágenes

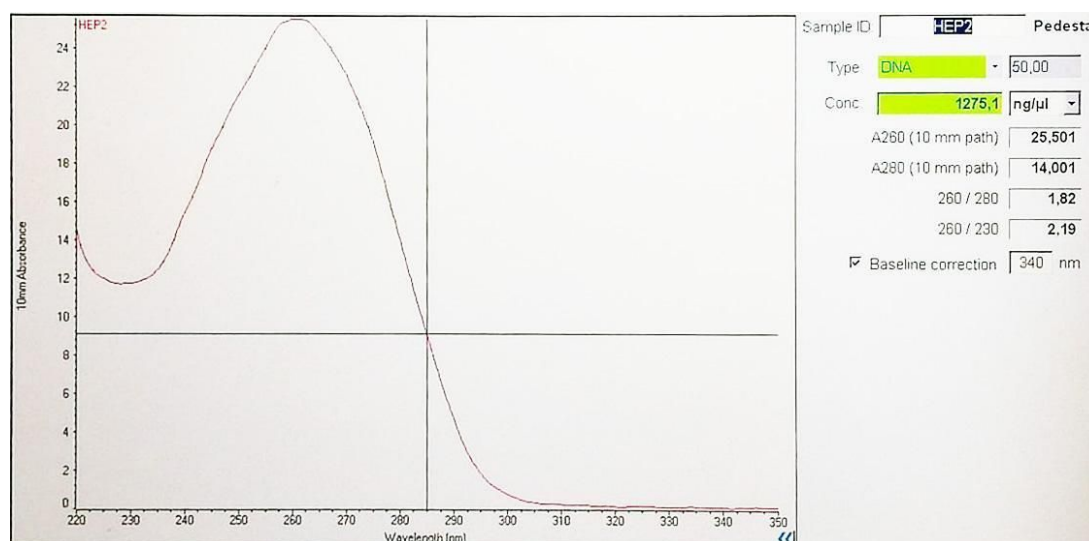


Imagen 5. Pureza y concentración de ADN de HEp-2.

Obtuvo una concentración de 1275.1 ng/ul, absorbancia a 260 nm de 25.501, absorbancia a 280 nm de 14.001 con relación 260/280 de 1.82 y 260/230 de 2.19.

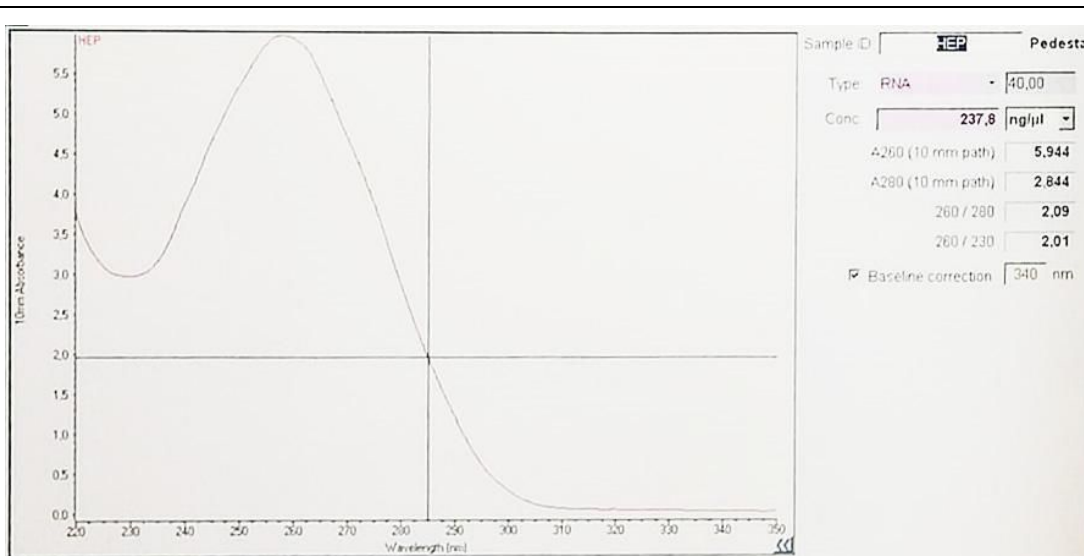


Imagen 6. Pureza y concentración de ARN de HEP-2.

Obtuvo una concentración de 237.8 ng/ul, absorbancia a 260 nm de 5.944, absorbancia a 280 nm de 2.844 con relación 260/280 de 2.09 y 260/230 de 2.01.

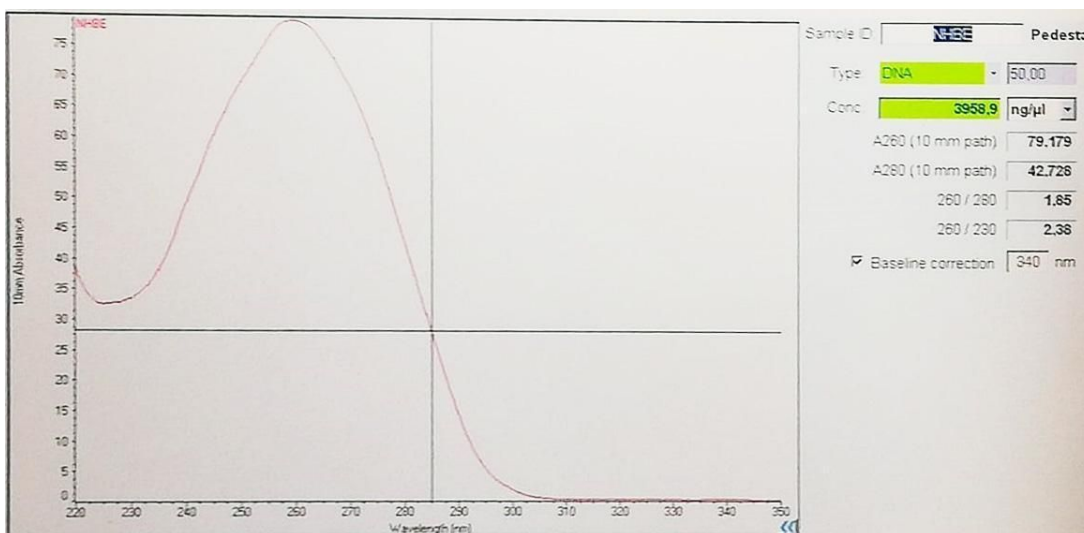


Imagen 7. Pureza y concentración de ADN de NHBE.

Obtuvo una concentración de 3958.9 ng/ul, absorbancia a 260 nm de 79.179, absorbancia a 280 nm de 42.728 con relación 260/280 de 1.85 y 260/230 de 2.38.

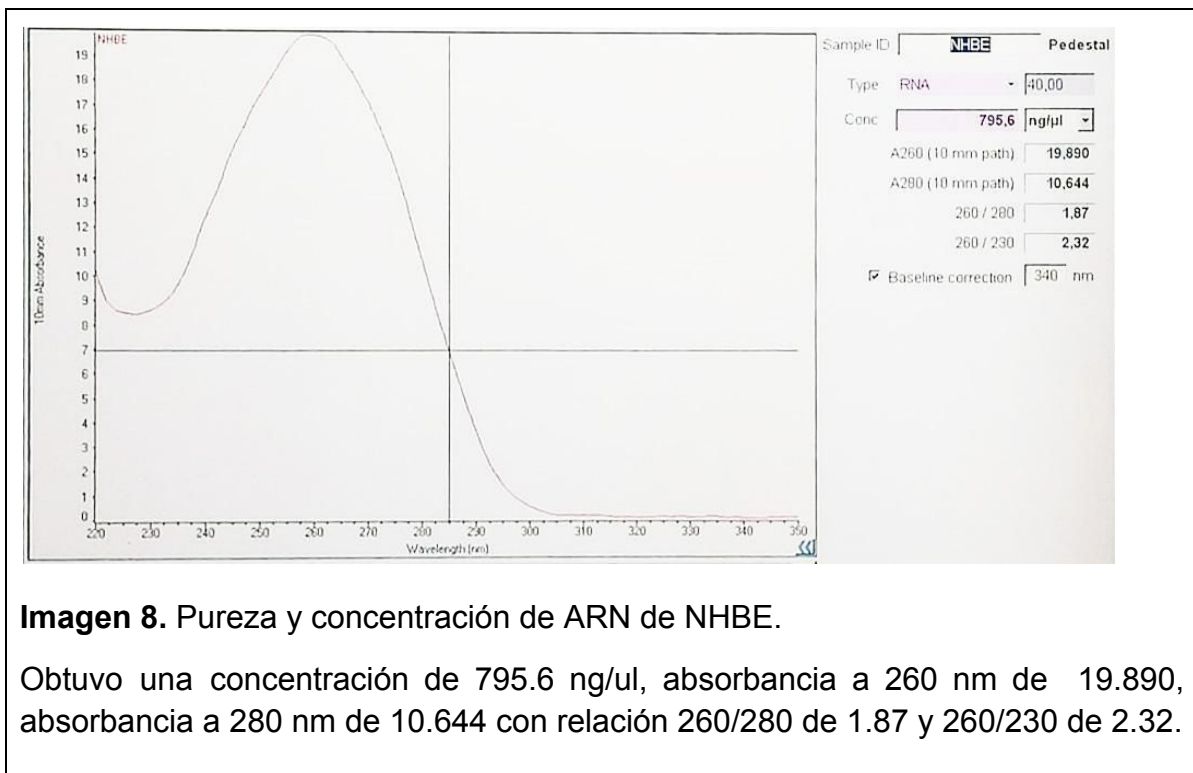


Imagen 8. Pureza y concentración de ARN de NHBE.

Obtuvo una concentración de 795.6 ng/ul, absorbancia a 260 nm de 19.890, absorbancia a 280 nm de 10.644 con relación 260/280 de 1.87 y 260/230 de 2.32.

Para determinar la expresión génica de las células antes de la aplicación del extracto se realizó electroforesis del ADN de HEp-2 y de NHBE, agregándole solución Máster mix y un *primer* específico de cada gen (SOX2, NANOG, OCT, CD146 y Beta actina) para amplificar sus secuencias y verificar su presencia en la células a estudiar el efecto, a continuación se presentan los resultados:

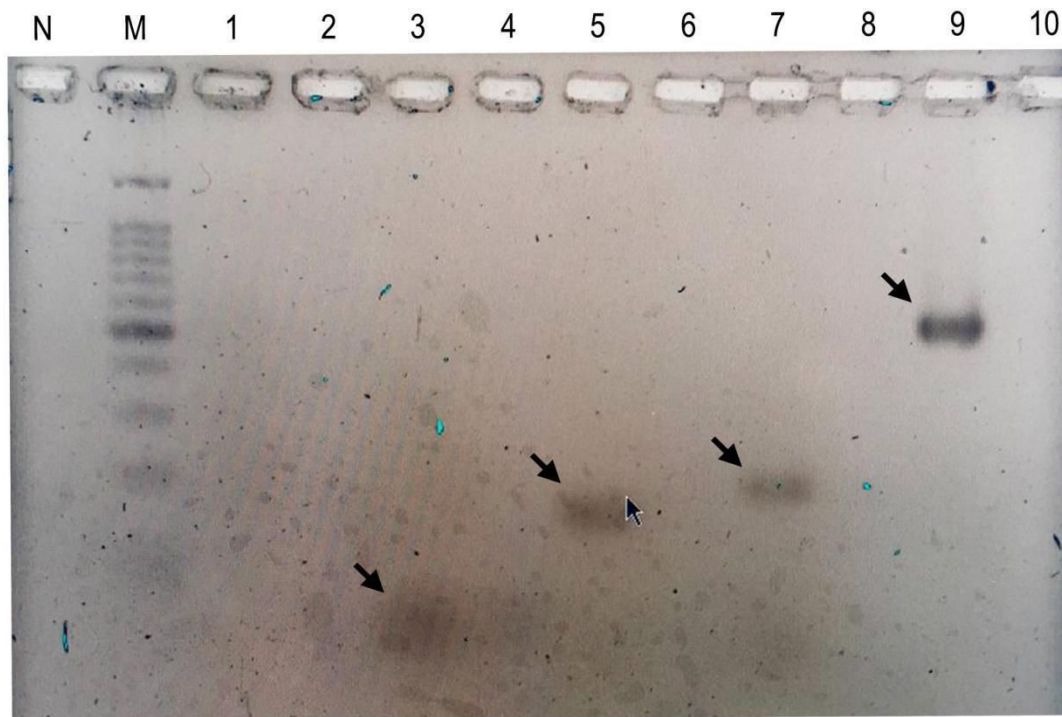


Imagen 9. Electroforesis en gel de agarosa. Comparación de la extracción de ADN de células HEp-2 (pozos 1, 3, 5, 7, 9) y NHBE (pozos 2, 4, 6, 8, 10) con los genes SOX 2 (pozos 1 y 2), NANOG (pozos 3 y 4), OCT4 (pozos 5 y 6), CD146 (pozos 7 y 8) y Beta actina (pozos 9 y 10) amplificados.

Las células HEp-2 expresaron todos los genes con excepción del gen SOX2, las células NHBE no expresaron ningún gen.

N: Control negativo. M: Marcador de peso molecular.

4.3 Evaluar la actividad inductora de diferenciación celular del extracto obtenido a partir de *Portulaca oleracea*.

Después de haberse realizado el pasaje de las células NHBE a nuevas cajas de petri, estas no evidenciaron crecimiento, por lo cual no se aplicó el extracto sobre ellas debido a su masa celular insuficiente.

Por lo tanto, el extracto fue aplicado al cultivo de células HEp-2, a expensas de que estas tienen un mayor grado de diferenciación celular y ya habían expresado los marcadores buscados en las células NHBE posterior a su exposición al extracto.

A continuación, se muestra el estado del cultivo de células HEp-2 3 días después de haber sido expuestas al extracto acuoso de *Portulaca oleracea*:



Imagen 10. Observación bajo microscopio óptico células HEp-2 a 4X. Se

observan colonias celulares tipo fibroblásticas sembradas en el medio de cultivo DMEN suplementado con suero fetal bovino a los 10 días de cultivo, 3 días después de que se agregó el extracto de *Portulaca oleracea*, con pobre distribución en monocapa. Se aprecia notoria disminución en los números celulares con pérdida de la homogeneidad en la distribución del cultivo, así como pérdida de la integridad de las membranas celulares con exposición de los componentes intracitoplásmáticos al medio extracelular.

5. Capítulo 5: DISCUSIÓN

El presente estudio tenía como objetivo determinar la eficacia del extracto de *Portulaca oleracea* como inductor de diferenciación en las células NHBE y HEp-2. aunque no se pudo determinar la magnitud del proceso de diferenciación celular debido al crecimiento incipiente de las células NHBE antes de la aplicación del extracto de *Portulaca*, además de la muerte de las células HEp-2 tras las exposición al mismo, los experimentos aportaron información valiosa que nos permite realizar los siguientes comentarios:

- La falta de crecimiento de las células NHBE luego del pasaje, es posible que esté asociado a los componentes empleados para el mismo, en especial la tripsina. Esta enzima actúa como una enzima proteolítica que descompone las proteínas que permiten la adhesión de las células a la superficie del recipiente que se empleó para el cultivo. Es de vital importancia que una vez se haya logrado dicho objetivo se degrade la enzima ya que puede degradar proteínas propias de las células y por lo tanto generaría alteraciones en el funcionamiento de las mismas. Los estudios demuestran que la tripsinización regula la baja expresión de proteínas relacionadas con el crecimiento y el metabolismo, y regula la alta expresión de proteínas relacionadas con la apoptosis (39). Es posible

entonces que la ausencia de crecimiento se haya debido a los efectos de la tripsinización sobre estas células.

- En la electroforesis encontramos que las células NHBE no presentaron ninguna banda durante el tiempo de corrido; pero se evidenció que la concentración de material genético tanto de ARN como ADN era mayoritario en estas células que en las HEp-2 después de haber realizado la espectrofotometría. Esto puede estar relacionado con la ejecución de la técnica RT-PCR, debido a que la vida media del ARN es muy corta (40). Igualmente su creciente labilidad *in vitro* pudo haber sido la causa del proceso de degradación de las moléculas. En este caso sin ADN molde era imposible que la enzima amplificara los genes objetivos. Esto explicaría el hecho de que ninguna banda haya sido revelada en las electroforesis, incluyendo los genes de CD146 y beta-actina, presentes en la gran mayoría de células humanas debido a si ⁴³ ciones estructurales (41-42).
- En la electroforesis de las células Hep-2 si bien se evidencia la presencia de los genes constitucionales propios de todas las células como son la beta-actina y el CD146 (41-42), también se encontraron los genes relacionados con la diferenciación celular NANOG y OCT4; no obstante la expresión de SOX2 no se evidenció, a pesar de que en células madre éste juega un papel fundamental en la regulación del desarrollo embrionario y en la determinación del destino celular (43). Se ha establecido que cuando las células avanzan en los procesos de diferenciación celular se llevan a cabo procesos de inducción y represión de genes específicos (44). La represión génica que ocurre se evidencia en las técnicas de reprogramación de células somáticas para generar células madre pluripotentes inducidas, donde por medio de factores presentes en células embrionarias humanas se logra la expresión de algunos genes marcadores de pluripotencialidad

cómo son OCT4, NANOG y SOX2 quienes en este estadio celular ya se encontraban reprimidos (45). Igualmente es posible que en el grado de diferenciación en el cual fueron immortalizadas las células HEp-2 se haya generado la supresión génica de SOX2. No obstante cabe la posibilidad de que la expresión del mismo se encuentre en niveles basales, lo que sería insuficiente para permitir su visualización en el gel de agarosa.

- Por espectrofotometría y electroforesis se evidenció la capacidad celular de expresión génica. Entonces lo que esto podría indicar es que las células se encontraban en un estado adecuado antes de que se le agregara el extracto, por lo que es posible que la causa de la muerte de las mismas se encuentre en el compuesto. 44 En se ha descrito que los extractos de *Portulaca oleracea* han mostrado la presencia de alcaloides, flavonoides, catequinas, aminoácidos, compuestos grasos, saponinas, taninos y azúcares reductores (20); los flavonoides, compuestos grasos y las saponinas actúan como poderosos antioxidantes capaces de consumir el H_2O_2 y ajustar el estado de óxido-reducción celular desencadenado durante los eventos de estrés a los que es sometida la célula; por su parte los alcaloides que se expresan como metabolitos secundarios ante la presencias de microorganismos en la planta, actúan mostrando efectos inhibitorios en el crecimiento de los mismos, debido a su capacidad de intercalarse con el ADN, detener la síntesis de proteínas, inducir la apoptosis e inhibir las enzimas del metabolismo de carbohidratos (46), es probable entonces que la presencia de estos últimos estén implicados en la muerte de las células; sin embargo los datos obtenidos no permiten confirmar la presencia o ausencia de éstos en el extracto, ya que como se mencionó anteriormente se requiere la presencia de microorganismos para su producción.

- El transporte pasivo de agua hacia el interior de la célula dado por osmosis así como también características químicas de esta como lo es la polaridad, podrían además de lo anterior estar relacionado con la posible muerte de las células; en cuanto a la ósmosis la entrada del agua permite la activación de un poro de Transición de Permeabilidad Mitocondrial (PTPm) que en condiciones fisiológicas se encuentra cerrado; la apertura de éste genera un edema mitocondrial debido a la entrada de agua al interior de la mitocondria como consecuencia del gradiente osmótico, por lo que la membrana mitocondrial se rompe desencadenando la liberación de citocromo C y factores pro-apoptóticos, además del desacoplamiento de la fosforilación oxidativa y sus factores alterando la homeostasis iónica y metabólica que a su vez activan las enzimas de degradación mitocondriales como las fosfolipasas, las n⁴⁵ sas y las proteasas, esta cadena de hechos genera muerte celular irreversible (47).
- Por último y quizás lo más importante es que las bajas concentraciones del extracto lograron generar la muerte de células tumorales. Esto crea la posibilidad de que *Portulaca oleracea* debido a que presenta una composición muy variada en cuanto a los tipos de estructuras químicas que posee, además de las ya descritas, genere sustancias que actúen de manera individual o en sinergia con otros compuestos, que de alguna manera podrían manifestar cierto tipo de efecto antitumoral. En la literatura se muestra el empleo creciente de la medicina verde en la prevención y cura de diferentes condiciones patológicas, lo que ha llevado a la evaluación de las plantas y sus extractos en el contexto de enfermedades cancerígenas, como es el caso de las plantas de la familia *Polipodeaceae* y de la familia *Euphorbiaceae* que han mostrado actividad antitumoral en la

leucemia linfocítica P-388. También se ha documentado la obtención de extractos a partir de diversas plantas entre los que se encuentran compuestos de tipo lactonas y diterpenos, para los cuales se han reportado cierta actividad antitumoral (48). En otros estudios se ha evaluado la actividad antitumoral del extracto acuoso de *Bornarea cornígera* en ratones a los cuales se les trasplantaron subcutáneamente células de Sarcoma 180; en este caso se reveló que el extracto tenía capacidad similar de supresión tumoral que la ciclofosfamida cuando era usado a bajas concentraciones. Se estableció que se podría esperar una mayor eficacia si se empleaba en mayores concentraciones, sin embargo, con la concentración al 1% se logró la mayor reducción y eliminación del tumor (49). Por esta razón es importante continuar con los estudios para identificar los compuestos activos en la *Portulaca* que podrían tener algún tipo de efecto antitumoral y lo cual podría explicar el porqué de la muerte celular en los experimentos planteados.

6. CAPÍTULO 6: CONCLUSIONES

La ejecución adecuada de las técnicas de biología molecular, es indispensable para el éxito de un proceso; valorar otras posibles sustancias que permitan el despegue de las células fijadas al sitio donde se llevó a cabo su cultivo, nos permitirá identificar si la tripsinización estuvo o no involucrada en la ausencia de crecimiento celular luego del pasaje. Otra falla es posible que esté presente en los tiempos de ejecución de la RT/PCR lo que podría explicar la ausencia de expresión génica en el corrido electroforético de las células NHBE.

Las células HEp-2 son células inmortalizadas en un estadio de diferenciación, ella puede estar expresando o reprimiendo cierto grupo de genes, la ausencia de SOX2 es posible que se deba a una represión génica o a una expresión basal del mismo que impidió su adecuada amplificación.

Por su parte, para explicar las razones por las cuales se llevó a cabo la muerte de las células HEp-2 posterior a la exposición del extracto se plantearon varias teorías enfocados en el contenido del extracto, ya que en la espectrofotometría y en el corrido electroforético se evidencia que las células HEp-2 se encontraban en adecuadas condiciones; es llamativo además como tan bajas concentraciones del extracto generaron la muerte de células tumorales, tras estos hallazgos se

propone continuar con experimentos para seguir valorando los efectos de los extractos de *Portulaca oleracea*.

7. CAPÍTULO 7: REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS

1. Osteoarthritis | Guidance and guidelines | NICE. [cited 2018 May 2]; Available from: <https://www.nice.org.uk/guidance/qs87#.WuojcaUnSVA.mendeley>
2. Osch GJVM Van. Regenerative therapy for osteoarthritis: hope or hype? Osteoarthr Cartil [Internet]. 2018;26: S5. Available from: <https://doi.org/10.1016/j.joca.2018.02.023>
3. Chahla J, Olivetto J, Mei-Dan O, Pascual-Garrido C. Terapias biológicas para el tratamiento de las lesiones del cartílago de la cadera. Rev Latinoam Cirugía Ortopédica [Internet]. 2016;1(1):37–46. Available from: <https://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S244497251630002X>
4. Martínez-Carpio PA, Navarro Moreno MA. Factores de crecimiento, lesión celular, proteincinasas dependientes de ciclinas y sus inhibidores: Su relevancia en la patología molecular del cáncer humano. Med Clin (Barc) [Internet]. 2003;120(7):265–71. Available from: [http://dx.doi.org/10.1016/S0025-7753\(03\)73673-2](http://dx.doi.org/10.1016/S0025-7753(03)73673-2)
5. Hashemibeni B, Valiani A, Esmaeli M, Kazemi M, Aliakbari M, Golshan Iranpour F, et al. Iranian Journal of Basic Medical Sciences Comparison of the efficacy of piascledine and transforming growth factor β 1 on chondrogenic

differentiation of human adipose-derived stem cells in fibrin and fibrin-alginate scaffolds Comparison of the efficacy of. Iran J Basic Med Sci [Internet]. 2018;21(February):212–8. Available from: http://ijbms.mums.ac.ir/article_10068_d13cd9fb63e32dba83e48a7603f6ce86.pdf

6. Fujii M, Takeda K, Imamura T, Aoki H, Sampath TK, Enomoto S, et al. Roles of Bone Morphogenetic Protein Type I Receptors and Smad Proteins in Osteoblast and Chondroblast Differentiation. Mol Biol Cell [Internet]. 1999;10(11):3801–13. Available from: <http://www.molbiolcell.org/cgi/doi/10.1091/mbc.10.11.3801>

7. Santamaría Cáseres LM. Evaluación de la actividad antiinflamatoria de extractos de verdolaga (*Portulaca oleracea*) en ratas (*Rattus norvegicus*) con edema inducido por carragenina, en el Bioterio Espoch. Esc Super Politécnica Chimborazo [Internet]. 2011;1(Prevención de desórdenes alimentarios):16–29. Available from: <http://dspace.esPOCH.edu.ec/bitstream/123456789/1468/1/34T00246.pdf>

8. pueblos indigenas de mexico. Biblioteca digital de la medicina tradicional mexicana [Internet]. 2009. Available from: <http://www.medicinatradicionalmexicana.unam.mx/monografia.php?l=3&t=Verdolaga&id=7511>

9. Chan K, Islam MW, Kamil M, Radhakrishnan R, Zakaria MNM, Habibullah M, et al. The analgesic and anti-inflammatory effects of *Portulaca oleracea* L. subsp. sativa (Haw.) Celak. J Ethnopharmacol. 2000;73(3):445–51.

10. Kumar, V. Abbas, A. Aster J; Robbins y cotran. patología estructural y funcional + studentconsult (spanish edition). 9th ed. ESPAÑA SAE, editor. S.A. ELSEVIER ESPAÑA; 2015. 928 p.

11. Kenneth C Kalunian M. Risk factors for and possible causes of osteoarthritis. octubre. 2017;1–20.
12. John Londoño, Ingris Peláez Ballesteros b , Francy Cuervo a , Ignacio Angarita, Rodrigo Giraldo y Ana María Santos, Prevalencia de la enfermedad reumática en Colombia, según estrategia COPCORD-Asociación Colombiana de Reumatología. Estudio de prevalencia de enfermedad reumática en población colombiana mayor de 18 años, Revista colombiana de Reumatología, <https://doi.org/10.1016/j.rcreu.2018.08.003>
13. OMS. Estrategia de la OMS sobre medicina tradicional 2014-2023. Organ Mund la Salud [Internet]. 2013;72. Available from: <http://apps.who.int/medicinedocs/documents/s21201es/s21201es.pdf>
14. Iranshahy M, Javadi B, Iranshahi M, Jahanbakhsh SP, Mahyari S, Hassani FV, et al. A review of traditional uses, phytochemistry and pharmacology of *Portulaca oleracea* L. J Ethnopharmacol [Internet]. 2017; 205:158–72. Available from: <http://dx.doi.org/10.1016/j.jep.2017.05.004>
15. Michael Tierra CA, Tierra CA. M. Planetary Herbology. Lotus Press; 1988. 199 p.
16. “*Portulaca oleracea*.” Real Jardín Botánico Proy Anthos [Internet]. [cited 2018 Mar 19]; Available from: <http://www.anthos.es>
17. “*Portulaca oleracea*.” Trop Missouri Bot Gard [Internet]. [cited 2018 Mar 19]; Available from: <http://www.tropicos.org/NameSynonyms.aspx?nameid=26200154>
18. Danin A, Baker, Herbert G. Tropicos | Name - *Portulaca oleracea* subsp. *granulato-stellulata* (Poelln.) Danin & H.G. Baker [Internet]. Israel Journal of

Botany 27. 1978 [cited 2018 Mar 19]. p. 189–94. Available from:
<http://www.tropicos.org/Name/50112898>

19. Zhou Y, Xin H, Rahman K, Wang S, Peng C, Zhang H. *Portulaca oleracea* L.: A review of phytochemistry and pharmacological effects. Biomed Res Int. 2015;2015(925631):11.

20. Lidia Elizabeth Guzmán Heras, Viviana García Mir, Osmany Cuesta Rubio, Carmita Gladys Jaramillo Jaramillo GERJ. Composición química y actividad antiinflamatoria de extracto de partes aéreas de *Portulaca oleracea* (verdolaga). Rev Cuba Farm [Internet]. 2017 [cited 2018 Jun 9]; Vol 51(1). Available from:
<http://www.revfarmacia.sld.cu/index.php/revfarmacia/article/view/185/78>

21. Wenden AL. Aspectos básicos sobre el manejo y preservación de los cultivos celulares. [Internet]. Vol. 3, Departamento de cultivo celular. 1981. Available from:
http://www.paho.org/hq/dmdocuments/2010/L_Brito_INHRR.pdf

22. Universidad del País Vasco, Gonzalez Mañas JM, Sanchez Marino A. Introducción al cultivo celular. Fac Cienc y Tecnol Univ del País Vasco [Internet]. 2015;12. Available from:
http://www.ehu.eus/biofisica/juanma/mbb/pdf/cultivo_celular.pdf

23. Scientific TF. What are Primary Cells? [Internet]. Learn More About Primary Cells. 2019 [cited 2019 May 26]. p. 1. Available from:
<https://www.thermofisher.com/co/en/home/life-science/cell-culture/primary-cell-culture/primary-cell-culture-resources/about-primary-cells.html>

24. Fields WR, Leonard RM, Odom PS, Nordskog BK, Ogden MW, Doolittle DJ. Gene expression in normal human bronchial epithelial (NHBE) cells following in vitro exposure to cigarette smoke condensate. Toxicol Sci. 2005;86(1):84–91.

25. W.R. Fields, R.M. Leonard, P.S. Odom, B.K. Nordskog, M.W. Ogden, D.J. Doolittle, Gene expression in normal human bronchial epithelial (NHBE) cells following in vitro exposure to cigarette smoke condensate, *Toxicol. Sci.* 86 (2005).
26. Lukasz Czekala, Liam Simms, Matthew Stevenson, Edgar Trelles-Sticken, Paul Walker, Tanvir Walele, High Content Screening in NHBE cells shows significantly reduced biological activity of flavoured e-liquids, when compared to cigarette smoke condensate, *Toxicology in Vitro* 58 (2019)
27. Commons C. Células HEp-2 [Internet]. p. 1–4. Available from: <https://creativecommons.org/licenses/by-sa/3.0/>
28. Wikipedia L enciclopedia libre. Células HEp-2 [Internet]. 1 de enero del 2019, 17:46 UTC. 2019 [cited 2019 52 3]. Available from: https://es.wikipedia.org/w/index.php?title=Células_HEp-2&oldid=112994745
29. W.R. Fields, R.M. Leonard, P.S. Odom, B.K. Nordskog, M.W. Ogden, D.J. Doolittle, Gene expression in normal human bronchial epithelial (NHBE) cells following in vitro exposure to cigarette smoke condensate, *Toxicol. Sci.* 86 (2005).
30. IsidoroMartínez, Luis Lombardía, Cristina Herranz, Blanca García Barreno, Orland Domínguez José A. Melero, Cultures of HEp-2 cells persistently infected by human respiratory syncytial virus differ in chemokine expression and resistance to apoptosis as compared to lytic infections of the same cell type, *Virology* Volume 388, Issue 1, 25 May 2009.
31. Vasundhra Kashyap, Naira C. Rezende, Kymora B. Scotland, Sebastian M. haffer, Jenny Liao Persson, Lorraine J. Gudas, and Nigel P. Mongan, Regulation of Stem Cell Pluripotency and Differentiation Involves a Mutual Regulatory Circuit of the Nanog, OCT4, and SOX2 Pluripotential Transcription Factors with Polycomb

Repressive Complexes and Stem Cell microRNAs, Stem cells and development
Volume 18, Number 7, 2009. DOI: 10.1089/scd.2009.0113

32. Contributors W. CD146 [Internet]. Wikipedia, The Free Encyclopedia. [cited 2019 Jun 9]. Available from:

<https://en.wikipedia.org/w/index.php?title=CD146&oldid=891253822>

33. Wang Z, Yan X. CD146, a multi-functional molecule beyond adhesion. Cancer Lett [Internet]. 2013;330(2):150–62. Available from:

<http://dx.doi.org/10.1016/j.canlet.2012.11.049>

34. NCBI. Gene_Result [Internet]. Ncbi. 2018. Available from:

<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/gene/7054#top>

35. Conditions G. Genetics Home Reference ACTB gene.

36. Española RA. Diccionario de la Lengua Española [Internet]. 2017. Available from: <http://dle.rae.es/?id=EPQzi07>

37. H. David Banta, Clyde J. Behney, Dennis P. Andrulis. The Concepts of Efficacy and Safety. Assess Effic Saf Med Technol [Internet].

1978;78–600117(2):133. Available from:

<https://www.princeton.edu/~ota/disk3/1978/7805/780504.PDF>

38. Papadakis A. La gran enciclopedia de economía [Internet]. EFICACIA. 2009. Available from: <http://www.economia48.com/spa/d/eficacia/eficacia.htm>

39. Huang HL, Hsing HW, Lai TC, Chen YW, Lee TR, Chan HT, et al. Trypsin-Induced proteome alteration during cell subculture in mammalian cells. J Biomed Sci. 2010;17(1):1–10.

40. Devlin. Bioquímica Devlin 4a Edición_booksmedicos.org.pdf. Editorial

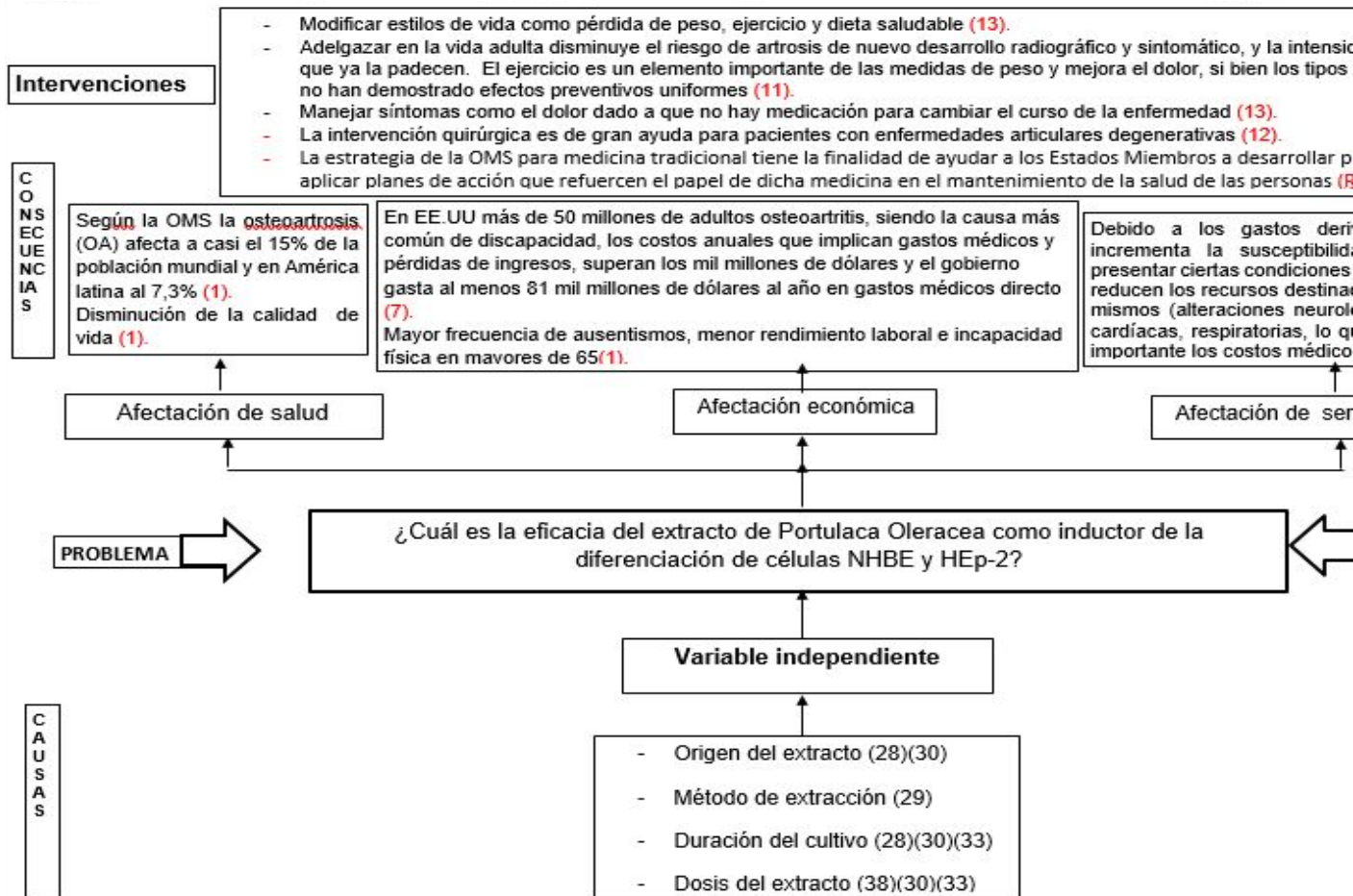
Reverté; 2004. 621 p

41. UniProt Consortium. UniProtKB - P43121 (MUC18_HUMAN) [Internet]. [cited 2019 Jun 9]. Available from: <https://www.uniprot.org/uniprot/P43121#function>
42. UniProtKB. UniProtKB - P60709 (ACTB_HUMAN) [Internet]. [cited 2019 Jun 9]. Available from: <https://www.uniprot.org/uniprot/P60709#function>
43. UniProtKB. UniProtKB - P48432 (SOX2_MOUSE) [Internet]. [cited 2019 Jun 9]. Available from: <https://www.uniprot.org/uniprot/P48432>
44. Serrano JL. Diferenciación celular y oncogenes. Dep Biol Mol Univ Cantab Santander. 1992;55–64
45. Chaparro O, Beltrán O. Reprogramación Nuclear y Células Pluripotentes Inducidas. Rev Fac Med. 2009;17(2):252–63.
46. Sepúlveda-jiménez G. Sepúlveda Jiménez, Gabriela; Porta Ducoing, Helena; Rocha Sosa, Mario. Rev Mex ⁵⁴ Patol [Internet]. 2003;21(3):355–63. Available from: <http://redalyc.uaemex.mx>
47. Pezoa J. Artículo de Revisión El PORO DE TRaNsICIÓN DE PERmEabIlIDaD mITOCOndRIal (PTPm) COmO blaNCO DE EsTRaTEglas CaRDIOPROTECTORas EN Daño POR IsqUEmla-REPERfUsIÓN mIOCaRDICa: ROI DE IOs aNEStésICOs INhalaTORIOs. Rev Chil Anest. 2012; 41:128–34.
48. Colom Y, Azcue M, Pérez R, Respall M, Ruiz R, Quesada W. Actividad antitumoral de extractos de plantas de la flora cubana frente a la Leucemia Linfocítica P-388. Rev Cuba Plantas Med [Internet]. 2005;10(2). Available from: http://scielo.sld.cu/scielo.php?script=sci_arttext&pid=S1028-47962005000200008

- 49 . Villanueva C, Rodríguez C, Lavado K, Barbieri M, Guzmán L, Alfaro R, et al. Efecto antitumoral del extracto acuoso de *Bomarea cornigera* (Alstroemeriaceae) en sarcomas inducidos en ratones. Rev Peru Biol. 2014;17(3):385–8.

8. CAPÍTULO 8: ANEXOS


Anexo 1: Figura 1. Árbol del Problema



Anexo 2: Esquema del procedimiento:

Preparación de los insumos	Análisis de los insumos	Pruebas y análisis de los efectos generados tras la combinación de los insumos
<ul style="list-style-type: none">• Preparación de los cultivos celulares y seguimiento de su crecimiento y proliferación• Recolección de <i>Portulaca oleracea</i>• Preparación de los extractos de <i>Portulaca oleracea</i>	<ul style="list-style-type: none">• Caracterización del perfil génico de las células madres previo a la exposición al extracto mediante RT-PCR	<ul style="list-style-type: none">• Exposición de los cultivos celulares a los extractos de <i>Portulaca</i>• Evaluación de la inducción de diferenciación en las células madres luego de la exposición al extracto mediante RT-PCR

Anexo 3: Carta de aceptación del comité de ética

 UNIVERSIDAD DEL NORTE
Comité de Ética en investigación de la División Ciencias de la Salud de la Universidad del Norte
ACTA DE EVALUACION: N°. 181 Fecha: 29 de noviembre de 2018
Nombre Completo del Proyecto: Eficacia del extracto de <i>Portulaca oleracea</i> como inductor de la diferenciación de las células madres de pulpa dental en condroblastos.
Investigador principal: Andrés Camilo Atencia Ortega, Rubén Darío Palmera Cárcamo, Carolina Sofía Pérez Lara, Andrea Carolina Pérez Orozco y Elkin David Peña García.

- Hojas de vida

2. El presente proyecto fue evaluado por los siguientes miembros:

- Dra. SILVIA GLORIA DE VIVO
Profesión: Abogada
Cargo en el Comité de Ética: Representante No Científico
- Dr. HERNANDO BAQUERO LATORRE
Profesión: MD. Pediatra y Neonatólogo
Cargo en el Comité de Ética: Representante Científico
- Dr. DIMAS BADEL MERLANO
Profesión: MD. Especialista en Bioética
Cargo en el Comité de Ética: Especialista en Bioética
- Enf. DANIELA DÍAZ AGUDELO
Profesión: Enfermera. Mg en Enfermería
Cargo en el Comité de Ética: Presidenta y Representante de Profesores
- Q.F. DONALDO DE LA HOZ
Profesión: Químico Farmacéutico
Cargo en el Comité de Ética: Representante experto en Farmacia Química
- Dr. PEDRO VILLALBA AMARIS
Profesión: Ingeniero Mecánico. Phd Ingeniero Biomédico
Cargo en el Comité de Ética: Representante Científico (Suplente)
- Dra. OLGA HOYOS DE LOS RÍOS
Profesión: PhD en Psicología
Cargo en el Comité de Ética: Representante de Profesores
- Dra. LOURDES MARTÍNEZ
Profesión: Administradora de empresas
Cargo en el Comité de Ética: Representante de la Comunidad
- Dr. ROBERTO SOJO GONZÁLEZ
Profesión: Administrador de empresas
Cargo en el Comité de Ética: Representante de la Comunidad (Suplente)
- Ing. JAIME GARCIA OROZCO
Profesión: Ingeniero Mecánico
Cargo en el Comité de Ética: Representante de la Comunidad (Suplente)
- Dr. RAFAEL TUESCA MOLINA
Profesión: MD. Phd. en Salud Pública
Cargo en el Comité de Ética: Representante Científico

- Dr. JEAN DAVID POLO VARGAS
Profesión: Psicólogo. Phd en comportamiento social y organizacional.
Cargo en el Comité de Ética: Miembro - Representante de Profesores (Suplente)
- Enf. DIANA DÍAZ MASS
Profesión: Enfermera
Cargo en el Comité de Ética: Representante de Profesores (Suplente)
- Q.F. SAMIR BOLIVAR
Profesión: Químico Farmacéutico
Cargo en el Comité de Ética: Representante experto en Farmacia Química (Suplente).
- Dra. VIRIDIANA MOLINARES HASSAN
Profesión: Abogada
Cargo en el Comité de Ética: Representante No Científica (Suplente)
- Dr. PEDRO VILLALBA AMARIS
Profesión: Ingeniero Mecánico. Phd Ingeniero Biomédico
Cargo en el Comité de Ética: Representante Científico (Suplente)

El Comité de Ética en Investigación en el Área de la Salud de la Universidad del Norte, se encuentra ubicado en la Universidad del Norte, KM 5 vía a Puerto Colombia. Primer piso Bloque F.

Contactos:

Correo electrónico: comite_eticauninorte@uninorte.edu.co

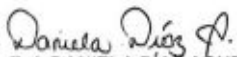
Página Web: www.uninorte.edu.co/divisiones/salud/comite_etica

Teléfono: 3509280 – 3509509 Ext. 3493

4. **El comité considero que el presente estudio:**
 - a. Es válido desde el punto de vista ético. La investigación se ajusta a los estándares de la buena práctica clínica.
5. **El Comité de Ética en Investigación en el Área de la Salud de la Universidad del Norte informara inmediatamente a las directivas institucionales:**
 - a. Eventos que son de notificación obligatoria por parte del investigador al comité de ética.
 - b. Cualquier cambio o modificación a este proyecto que haya sido revisado y aprobado por este comité.
6. **El Comité informara inmediatamente a las directivas, toda información que reciba acerca de:**
 - a. Lesiones o daños a sujetos humanos con motivo de su participación en la investigación problemas imprevistos que involucren riesgos para los sujetos u otras personas cuando aplique.

- b. Cualquier cambio o modificación a este proyecto que haya sido revisado y aprobado por este comité.
- 7. Cuando el Protocolo es aprobado por el Comité de Ética en Investigación en el Área de la Salud de la Universidad del Norte, será por un periodo de un (1) año a partir de la fecha de su aprobación; según Guías Operativas CE_versión 22 agosto 10 de 2017 literal seguimiento a estudios aprobados el comité de ética en investigación.
- 8. El Investigador principal deberá:
 - a. Informar cualquier cambio que se proponga a introducir en el proyecto. Estos cambios no podrán ejecutarse sin la aprobación previa del COMITÉ DE ÉTICA EN INVESTIGACIÓN EN EL AREA DE SALUD DE LA UNIVERSIDAD DEL NORTE. Si estos son necesarios para minimizar o suprimir un peligro inminente o un riesgo grave para los sujetos que participan en la investigación deben ser notificados al comité de ética tan pronto sea posible cuando aplique.
 - b. Notificar cualquier situación imprevista que implica algún riesgo para los sujetos comunidad o el medio en el cual se lleva a cabo el estudio cuando aplique.
 - c. Informar la terminación prematura o suspensión del proyecto explicando causas y razones.
 - d. Presentar a este comité un informe cuando haya transcurrido un año, contado a partir de la aprobación del proyecto. Los proyectos con duración mayor a un año, serán reevaluados a partir del primer informe entregado.
 - e. Todos los proyectos deben entregar al finalizar un informe final de cierre del estudio, firmado por el investigador responsable.
- 9. Concepto del Comité de Ética:
 - a. En reunión del Comité de Ética en Investigación en el Área de la Salud de la Universidad del Norte, efectuada el 29 de noviembre de 2019, y legalizada mediante acta No. 181, el consenso de sus miembros aprueba el proyecto de investigación titulado: Eficacia del extracto de *Portulaca oleracea* como inductor de la diferenciación de las células madres de pulpa dental en condroblastos.

Atentamente,



Enf. DANIELA DÍAZ AGUDELO

Profesión: Enfermera. Mg en Enfermería

Cargo: Presidente Comité De Ética en Investigación del Área de la Salud de la Universidad del Norte.

 **UNIVERSIDAD DEL NORTE**
Comité de Ética en Investigación
en el Área de la Salud

ENTREGADO 13 DIC. 2010

Anexo 4: Tabla 3. Cronograma

ACTIVIDADES	Tiempo (semanas)																	
ETAPAS DE PLANIFICACIÓN DEL PROYECTO	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12	13	14	15	16	17	
Definición del tema y palabras claves																		
Revisión de bibliografía																		
Definición del tema y problema																		
Elaboración de la propuesta de investigación																		
Presentación y sustentación de la propuesta de investigación																		

[illegible]